

| | | |
|--------------------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F 1 | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/53 | GO 1 N 33/53 M | 2 GO 4 3 |
| C 1 2 M 1/00 | GO 1 N 33/53 D | 2 GO 5 9 |
| GO 1 N 21/27 | C 1 2 M 1/00 A | 4 B O 2 9 |
| GO 1 N 21/63 | GO 1 N 21/27 C | |
| GO 1 N 33/543 | GO 1 N 21/63 Z | |
| 審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁) 最終頁に続く | | |

| | |
|--|--|
| (21) 出願番号 特願2003-283523 (P2003-283523) | (71) 出願人 301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関 1-3-1 |
| (22) 出願日 平成15年7月31日 (2003. 7. 31) | (72) 発明者 玉田 薫 茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内 |
| | (72) 発明者 八瀬 清志 茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内 |
| | F ターム (参考) 2G043 AA03 BA16 DA01 DA06 EA06 EA14 FA02 FA09 NA01 NA05 2G059 AA05 BB12 EE02 FF03 GG01 HH01 HH02 HH03 HH06 MM01 MM09 4B029 AA07 FA12 |

(54) 【発明の名称】 光検出用バイオ素子とバイオ検出方法

(57) 【要約】
【課題】高密度集積化して、高精度分析ができる光検出型バイオ素子（二次元薄膜チップ）及び並列的に、短時間で高精度で分析するバイオ検出方法を提供する。
【解決手段】機能性分子の単分子膜がパターン形成された基板からなり、前記機能性分子に対してナノ微粒子表面の、機能性官能基を有する基を分子認識反応によって結合させて検出するバイオ素子であって、基板に結合したときの前記ナノ微粒子相互の間隔が100～1000nmになるように調節したバイオ素子。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

機能性分子の単分子膜がパターン形成された基板からなり、前記機能性分子に対してナノ微粒子表面の、機能性官能基を有する基を分子認識反応によって結合させて検出するバイオ素子であって、基板に結合したときの前記ナノ微粒子相互の間隔が100～1000nmになるように調節したことを特徴とするバイオ素子。

【請求項2】

前記ナノ微粒子の粒径が5～50nmであることを特徴とする請求項1記載のバイオ素子。

【請求項3】

前記の機能性分子及びナノ微粒子が、DNA分子間又はDNA-RNA分子間のハイブリダイゼーションにより結合することを特徴とする請求項1又は2に記載のバイオ素子。

【請求項4】

前記の機能性分子及びナノ微粒子が、抗原抗体反応により結合することを特徴とする請求項1又は2に記載のバイオ素子。

【請求項5】

基板に結合した前記ナノ微粒子相互の間隔が前記の間隔となるように、分子の自己組織化性を利用して機能性分子を基板上に配列することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のバイオ素子の製造方法。

【請求項6】

請求項1～4のいずれか1項に記載のバイオ素子上に前記ナノ微粒子を結合させた後、該バイオ素子上に光を照射して、微粒子における光吸収又は光発光により該バイオ素子上のナノ微粒子1粒子単位で高感度に検出することを特徴とするバイオ検出方法。

【請求項7】

前記ナノ微粒子が1粒子単位で表面プラズモン現象により検出されることを特徴とする請求項6記載のバイオ検出方法。

【請求項8】

前記ナノ微粒子が1粒子単位で量子発光により検出されることを特徴とする請求項6記載のバイオ検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光検出型バイオ素子（バイオチップ）に関するものであり、特にバイオ素子上に反応した微粒子を1微粒子単位で検出し、基板上の $10^6 \sim 10^8$ 個の測定点をより正確に、かつ定量的に測定することを可能とした高感度光検出型バイオ素子とその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオナノテクノロジー分野における重要課題であるバイオチップ開発は、（1）高選択性（分子識別能の向上）、（2）高感度化（微量サンプルからの大きな信号）、（3）分離・精製等のプロセスの単純化・分析時間の短縮、（4）診断装置の低価格・軽量・小サイズ化等を中心に、世界レベルで競争的な研究開発が行われている。

PCR法は、試料を増幅するのに時間がかかり、また多段階の複雑なプロセスを経るため判定誤差が生じやすく、さらに塩基配列の分析に蛍光ラベルが必要であり、多種多様なDNAプローブのすべてに蛍光処理を施さなければならぬため時間及びコストがかかっていた。これに対し固体基板型バイオチップ（DNAマイクロアレイ）は、ゲノムDNAを基板表面にアレイ状に配置・固定したものであり、その情報は基板表面について高感度分析を行うことにより処理される（例えば、特許文献1参照）。これによればPCRによる増幅を経ずに直接DNA鎖の分析・同定を行うことができる。したがって、固体基板型バイオチップは、上記（1）～（4）の項目について、PCR法よりも潜在的に優れてい

るといわれている。

【0003】

従来の一般的なバイオ素子の検出方法について、図7を参照しながら具体的に説明する。図7は、従来のバイオ素子の検出方法の説明図である（出典：Ming, Li et al., "Langmuir", 2002, 18, 805）。図7中、(a)は各種のDNAプローブ（W1～W4）をそれぞれ固定化したユニット42を設けたバイオ素子41を示す。(b)、(c)、(d)及び(e)は、W1のプローブに相補的なC1DNA、W2に相補的なC2DNA、W3に相補的なC3DNA、W4に相補的なC4DNAがそれぞれバイオ素子41に選択吸着されたときのプラズモン検出結果を示す。従来のバイオ素子の検出は、バイオ素子41上における1ユニット例えばユニット42について分子認識反応が行われたか否かを検出し、分子認識反応が行われたユニットの位置確認が行われていた。そして、このユニットの位置確認を容易にするための分子識別能の向上や高感度検出の研究が行われていた。

分子認識能を向上させるための表面作製法については様々な研究開発が進められており、例えば、特許文献1には表面被覆率及び活性度を高めた基板表面が記載されている。

しかし、この方法では検出のために蛍光プローブ等でターゲット核酸を修飾する必要があるが操作が煩雑で、しかも検出精度が低い（再現性が悪い）。

【0004】

一方、信号強度を増幅させる方法についても様々な研究開発が進められており、例えば、特願2003-128818号明細書には、金粒子をターゲット核酸に固定させることにより検出感度を向上させる方法が記載されている。

【0005】

しかし、従来技術はいずれも、分子認識反応が行われた巨視的表面に対して信号強度を上げて検出を容易にすることを目的とした研究が主であり、反応点を高密度、集積化させた上での分子認識、検出という観点では未だ検討は行われていないのが実情である。したがって、従来技術では検出感度を向上させてはいるものの、得られる情報量としては○×という二者択一的に判定するに留まっている。

【特許文献1】特開2003-43037号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、大量の情報を並列的に短時間で処理し、高密度集積化でき、高精度で分析できる光検出型バイオ素子（二次元薄膜チップ）を提供することを目的とする。また、本発明は、短時間かつ高精度で分析するバイオ検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

ところで、本発明者らはナノ微細加工技術について研究し、平面金属基板上における自己組織化膜（Self-Assembled Monolayers、以下SAM膜ともいう）の作製に成功している（「イミダス2003」、集英社、2002年、p. 267）。この自己組織化膜では、分子間相互作用により分子が集合して（自己集合体形成）、特定の模様、いわゆるナノドットが形成される。

本発明者らはこの知見に基づき鋭意検討を重ねた結果、ナノ微細加工技術とナノ微粒子を組み合わせることにより、高密度集積型バイオチップを提供することが可能となることを見出した。この高密度集積型バイオチップでは、例えば、光検出を用いることで、測定点が極めて多量であっても全ての測定点のそれぞれを短時間で検出することができ、またフーリエ変換等の技術により単純なパターン信号として照合・記録・保存が可能である。これにより、従来は○×でしか判定されなかったバイオセンシングの結果を、たとえば100ドット中95ドット反応といったデジタル表示で提示することが可能となる。本発明はこのような知見に基づきなされるに至ったものである。

すなわち本発明は、

(1) 機能性分子の単分子膜がパターン形成された基板からなり、前記機能性分子に対し

てナノ微粒子表面の、機能性官能基を有する基を分子認識反応によって結合させて検出するバイオ素子であって、基板に結合したときの前記ナノ微粒子相互の間隔が100～1000nmになるように調節したことを特徴とするバイオ素子、

(2) 前記ナノ微粒子の粒径が5～50nmであることを特徴とする(1)項に記載のバイオ素子、

(3) 前記の機能性分子及びナノ微粒子が、DNA分子間又はDNA-RNA分子間のハイブリダイゼーションにより結合することを特徴とする(1)又は(2)項に記載のバイオ素子、

(4) 前記の機能性分子及びナノ微粒子が、抗原抗体反応により結合することを特徴とする(1)又は(2)項に記載のバイオ素子、

(5) 基板に結合した前記ナノ微粒子相互の間隔が前記の間隔となるように、分子の自己組織化性を利用して機能性分子を基板上に配列することを特徴とする(1)～(4)のいずれか1項に記載のバイオ素子の製造方法、

(6) (1)～(4)のいずれか1項に記載のバイオ素子上に前記ナノ微粒子を結合させた後、該バイオ素子上に光を照射して、微粒子における光吸収又は光発光により該バイオ素子上のナノ微粒子1粒子単位で高感度に検出することを特徴とするバイオ検出方法、

(7) 前記ナノ微粒子が1粒子単位で表面プラズモン現象により検出されることを特徴とする(6)項に記載のバイオ検出方法、および

(8) 前記ナノ微粒子が1粒子単位で量子発光により検出されることを特徴とする(6)項に記載のバイオ検出方法
を提供するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明の光検出型バイオ素子は、高密度集積化でき、高精度で分析できるという優れた効果を奏する。

また、本発明のバイオ検出方法は、大量の情報を並列的に短時間で処理することができるという優れた効果を奏する。すなわち、測定点が極めて多量であっても、光検出を用いることにより短時間で検出することができ、またフーリエ変換等の技術により単純なパターン信号として照合・記録・保存が可能である。これにより、従来は○×でしか判定されなかったバイオセンシングの結果を、たとえば100ドット中95ドット反応といったデジタル表示で提示することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

光による信号検出の空間分解能は、近接場光学、光干渉法等の技術進展により確実にダウンサイジング化が進んでいるが、本発明における空間分解能は100～1000nmの領域である。本発明では、際限無く小さなナノ微粒子を用いて高密度集積化するのではなく、光検出との関連において1粒1粒を検出し得る最適な大きさのナノ微粒子を用いて高密度集積化を実現するものである。

以下、本発明のバイオ素子の好ましい実施態様について、添付の図面に基づいて詳細に説明をする。なお、各図の説明において同一の要素には同一の符号を付す。

【0010】

図1は、基板上に配列された機能性分子とナノ微粒子との分子認識反応の説明図であり、図1(a)はナノ微粒子との分子認識反応前のバイオ素子の状態を、図1(b)はナノ微粒子との分子認識反応後のバイオ素子の状態を表す。ここで、分子認識反応とは、(1) DNA分子間又はDNA-RNA分子間のハイブリダイゼーション、(2) 抗原抗体反応、(3) 酵素-基質間の反応など、生体関連材料間の特異的相互作用に由来する反応である。図1では、ビオチンとアビジンの抗原抗体反応による分子認識反応(分子識別反応)の例が示されている。

本発明のバイオ素子1は、ナノサイズの金属又は半導体微粒子(ナノ微粒子6)が所定の間隔で基板上に1個ずつ固定されるように、ナノ微粒子6が結合しうる機能性分子4を

基板2上に配列して作製される。

【0011】

本発明に用いられる基板2の材質は特に限定されず、例えばガラス、マイカ、シリコンウェハ等が挙げられる。この基板の片面には金属薄膜3が形成される場合もある。例えば、マイカ基板上に金単結晶膜を形成する場合、まずマイカへき開面を超高真空チャンバー内($1.33 \times 10^{-5} \sim 1.33 \times 10^{-7} \text{ Pa}$ ($10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ Torr}$))でプレベイク(マイカへき開面を清浄化するため $500 \sim 600^\circ\text{C}$ の高温で一定時間加熱)した後、温度及び蒸着速度制御下で金を蒸着し、その後再び高温でアニール処理した後、室温に冷却して作製される。蒸着時の基板の最適温度は、通常は $300 \sim 450^\circ\text{C}$ の範囲内であり、蒸着速度及び真空度により多少変動するが、最適温度範囲が狭いので、 $\pm 5^\circ\text{C}$ 程度の微妙な温度制御が必要になる。このため、通常、マイカ基板は基板用ヒーターに背面から均一に接触するようにセットされ、片面のみに金が蒸着される。

【0012】

本発明における基板2上の薄膜3に用いられる金属の例としては、前記の金単結晶膜のほかに、銀、銅、白金、水銀、鉄、酸化鉄などが挙げられる。いずれも通常行われる蒸着等の方法によって基板上に薄膜を形成することができ、膜厚は通常数 100 \AA ～数 $100 \mu\text{m}$ である。

【0013】

本発明に用いられる機能性分子4とは、ナノ微粒子6との分子認識反応に寄与する機能性官能基(分子認識部位)5を有する分子をいう。分子認識反応に寄与する機能性官能基を有する分子としては、物理吸着を抑え選択的反応のみを確実に起こすような立体構造を有するDNA・RNA誘導体、抗体又は抗原分子と選択的に反応する抗原又は抗体などが挙げられる。本発明においては、DNA誘導体や、抗原抗体反応を起こすアビジン及びビオチン等が好ましく用いられる。

なお、本発明における分子認識反応による機能性分子とナノ微粒子との結合反応としては、機能性分子4とナノ微粒子6とが直接結合する反応のほかに、第三物質10を介して間接的に結合する反応(すなわち、機能性分子4-第三物質10間における反応と第三物質10-ナノ微粒子6間における反応)であってもよい。

また、本発明に用いられる機能性分子は、後述する自己組織化性を有するのが好ましく、含硫黄有機分子であることが好ましい。

【0014】

本発明における含硫黄有機分子とは、チオール($-\text{SH}$)基、ジスルフィド($-\text{S}-\text{S}-$)基、モノスルフィド($-\text{S}-$)基、チオフエンなどの含硫黄官能基を有する有機分子であり、チオール基又はジスルフィド基を有する有機分子が好ましい。有機分子としては例えば、置換基を有してもよい炭素数 $1 \sim 22$ 、好ましくは $4 \sim 18$ の直鎖又は分岐の脂肪族飽和アルキル、脂肪族不飽和アルキル、ポリエチレングリコール鎖などがあげられ、置換基としてはさらに置換されていてもよいフェノキシ基、炭素数 $1 \sim 22$ のフルオロアルキル基、カルボン酸基、アミノ基、シアノ基、アミド基、エステル基、スルホン酸基、ハロゲン原子(ブロモ基、クロロ基、ヨード基等)、ピリジン基、ペプチド基、フェロセン基、各種ポリマー鎖、蛋白質や核酸塩基等の生体関連物質などがあげられる。本発明における含硫黄有機分子の具体例としては、例えばオクタデカンチオール、アゾフェノキシドデカンチオール、ペルフルオロオクチルペンタンチオール、ブタンチオール、ヘキサンチオール、オクタンチオール、ドデカンチオール、ジオクタデシルジスルフィド、システイン、シスタミン、チオフエン、メルカプトオクタデシルアミン、メルカプトオクタデカノール、メルカプトオクタデカン酸などが挙げられる。また、特開2000-264874号公報に記載のジスルフィド誘導体化合物、特開2002-20368号公報に記載のアゾベンゼン誘導体化合物、特開2001-261681号公報に記載のフタロシアニン誘導体化合物も本発明に好ましく用いることができる。

【0015】

機能性分子4は、金属薄膜3を片面に有する基板2表面に配列される(図2参照。なお

、図2は、分子認識反応後のバイオ素子上における1ユニットの斜視図である)。

機能性分子を、金属薄膜を片面に有する基板表面に配列する方法としては、アレイ法における一般的な手法を用いることができるが、例えば含硫黄有機分子の共吸着、ブロック共重合体の相分離、蛋白質またはポリマー／シリカ粒子からなる2次元結晶を鋳型にした金属蒸着も使用可能である。

【0016】

含硫黄有機分子の共吸着によれば、2種の含硫黄有機分子を一定条件下で基板上に共吸着させることにより、含硫黄有機分子の自己組織化性(分子間相互作用による自己集合体形成)を利用して、所定の間隔で自発的にナノサイズの表面パターン(ナノドット)を形成することができる(例えば、Surface Phase Behavior of n-Alkanethiol SAMs Adsorbed on Au(111): An Atomic Force Microscope Study, K. Tamada; M. Hara; H. Sasabe; W. Knoll Langmuir 1997, 13, 1558.等参照)。

ブロック共重合体の相分離によれば、基板に対するアフィニティーの異なるユニットからなるブロック共重合体を基板上に単分子膜吸着させ、相分離ナノ構造の表面パターンを形成することができる(例えば、Spatz, J. P. et al., "Macromolecules", 1997, 30, 3874)。

蛋白質またはポリマー／シリカ粒子からなる2次元結晶又はポーラス材料を鋳型にした金属蒸着によれば、様々な表面パターンを形成することができる。

【0017】

本発明においては、分子の自己組織化性を利用した含硫黄有機分子の共吸着により、機能性分子を配列させることが好ましい。例えば、含硫黄有機分子雰囲気下に一定時間放置する気化吸着法(蒸着も含む)、含硫黄有機分子希薄溶液中に一定時間浸漬する浸漬法などの通常の自己組織化膜形成の方法・条件で、自己組織化膜を形成することができる。SAM膜形成の時間は1mm²の溶液に浸漬した場合、通常数分～24時間であり、分子鎖長相当の膜厚の単分子膜が得られる。

【0018】

なお、基板上の機能性分子のナノドットは整然と配列されたものでなくともよい。例えば、結合するナノ微粒子がランダム配列したものでなく、この態様では、AFM等により反応前の基板状態を観察しておき、ナノ微粒子結合後の基板状態と比較して分子識別反応の有無を算出することができる。この態様は基板作製が容易であるので好ましい。

【0019】

本発明において、基板上に配列される機能性分子相互の間隔は、分子認識反応により機能性分子に結合するナノ微粒子相互の間隔が100nm以上、好ましくは測定に用いる波長程度、より好ましくは測定に用いる波長以上となるようにデザインされる。ナノ微粒子相互の間隔が狭すぎると個々の微粒子を空間的に識別できず、1粒子単位の検出ができなくなる。一方、ナノ微粒子相互の間隔が広すぎると微粒子が分散しすぎて空間集積度が低く、高密度集積化、高感度化の実現の上から望ましくない。ナノ微粒子相互の間隔は広くても1000nm以下が好ましい。本明細書においてナノ微粒子相互の間隔とは、1つの微粒子の中心から別の微粒子の中心までの距離をいう。

なお、ビオチン-アビジンあるいはDNA鎖のハイブリダイゼーション等で知られているように、分子認識反応の効率は機能性分子の基板表面における分散状態に大きく依存する。したがって、機能性分子の基板表面における空間的配置については、表面プラズモン分光法、赤外分光法、X線光電子分光法等により評価し、最も反応効率のよい分散状態となるように配置する。例えば、K. Tamada et. al., "Langmuir", 2001, 17 (6), p.1913-1921等に記載の方法を用いることができる。

【0020】

次に、本発明のバイオ素子1に結合しうるナノ微粒子6について説明する。

ナノ微粒子は基板上の機能性分子のナノドットに結合しうる。このとき本発明において微粒子を上記のように所定の間隔に位置させるようにすることにより、高集積化による、高感度検出が可能となる。すなわち、試料分子(例えばDNA等)そのものを検出する場

合や色素ラベル分子を検出する場合、1分子あたりの信号強度が微弱かつ不安定であるために、1検出点をさほど小さくできない。たとえば0.1~1mm四方といったエリアで染色するのが通常であるが、その場合その面積中に存在する分子数はすでに天文学的数字(1分子サイズを1nmとしても0.1mm四方に存在する分子数は 10^{12})になるにもかかわらず、従来はその評価基準が単に○×のいずれかで、1点のデータとしてしか利用されていない。

【0021】

これに対して、機能性微粒子(例えば粒径20nmの粒子)を組み合せた場合、まず粒子表面に存在する分子数は約1000個にも達し(図1では説明上から1個だけ描いてある)、その表面分子のうちのいずれかが基板表面分子と反応すれば1粒子の吸着となるので、反応の確実性は1分子対1分子の反応に比べて格段高くなる。また微粒子からの光信号は十分に増幅できる(特に金属微粒子ではプラズモンによる効果で信号が100倍以上に増強されうる)ので、微粒子単位でオンオフが明確に識別できる。

つまり微粒子化することで、(1)機能性基間の分子認識反応の選択性が確実に高まる(2)光信号として安定で強力な信号の発生が実現され、高感度の検出ができる、の両方の機能が奏され、そして(3)空間的集積度を最大にしたときの、合成可能な金属微粒子の1粒子がサイズのちょうど粒子単位で全粒子を信号化するのに適合する(数百nm間隔のパターン上に約10倍小さい数十nmの微粒子がおかれる形になる)。

具体的には、仮に500nm間隔で吸着点を分散させた場合、1mm四方の基板でのデータ数は 4×10^6 個となり、従来のマイクロアレイ法(1枚のスライドガラスで数百~数千データ)に比べて格段の集積率下で格段の分解能を持つこととなる。

【0022】

ナノ微粒子6は、金属又は半導体の粒子7の表面にターゲット分子8が結合しており、該ターゲット分子は基板2上の機能性分子4との分子認識反応に寄与する機能性官能基(分子認識部位)9を有する。機能性官能基を有する分子の具体例は、前記機能性分子に挙げたものと同様である。

ナノ微粒子に用いられる金属粒子としては、前記基板に挙げたものと同様であり、半導体粒子の例としてはGaAs、InPなどが挙げられる。本発明においては金微粒子を用いるのが好ましい。

金微粒子は、金イオンを溶液中で界面活性剤存在下で還元し、金ナノ微粒子を作製する。その際、チオール分子を混在あるいは後に表面置換反応により導入することにより、金微粒子表面をチオール分子で均一に覆うことができる。例えば、分子認識反応に寄与できる官能基を分子末端に持つ機能性チオール($X-(CH_2)_n-SH$, ここでXは機能性官能基)を用いれば機能性基で覆われた金属微粒子を作製することができる(A. Manna.; P.L. Chen; H. Akiyama; T.X. Wei.; K. Tamada; W. Knoll. Chem. Mater. 2003, 15, 20-28等参照)。

機能性チオールを微粒子合成に用いる場合、機能性官能基が還元剤との接触により破壊されてしまう心配があるため、合成の際には、Brust, M. et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994, 801、Brust, M. et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995, 1655等に記載の手法を改良したものを用いる。これは還元による微粒子コアの作製過程はチオール抜ききの界面活性剤でのみ行い(1st step)、その後還元剤を除去した後に、表面での置換反応により機能性チオールを微粒子表面に導入する(2nd step)ものである。この場合、微粒子のサイズは1st stepの際に用いる界面活性剤の種類によって決まり、例えばバイオ関連材料(親水性微粒子)においては、シトラス酸やタンニン酸等が用いられている。

【0023】

本発明では、1粒子単位での光(可視光)検出ができるので、粒径としては数ナノメートルの最小サイズではなく、むしろプラズモン吸収、光散乱等の効果が増大する数十nm以上の比較的大きな微粒子をあえて合成して用いることができる。最適粒径は用いる光の波長によって変化するが、好ましくは100nm以下、より好ましくは5~50nm、さ

らに好ましくは10～30nmである。

【0024】

次に、基板上へのナノ微粒子の導入方法を説明する。

本発明では1粒子それぞれを光(可視光)検出の検出点として用いるため、検出点の表面集積密度(表面パターンニングのサイズ)としては、光検出の場合、空間分解能で対応できるサイズにまで微細化する。つまり微粒子相互の間隔が、波長サイズから波長以下程度(100nm以上、好ましくは100～1000nm、より好ましくは300～500nm)となるように導入する。ナノ微粒子は基板上の機能性分子のナノドットに結合するので、ナノドット間隔を上記の距離とする。

【0025】

数百nmのパターンの金基板上に、ナノ微粒子との認識反応に寄与する機能性分子を自己組織化により塗り分けて固定化する技術は種々あり、本発明には、それらのすべてが基本的に適応可能である。例えば、キャピラリー法(溝を切ったプレートを表面に押し付け、溝部に含硫黄有機分子を含む溶液をキャピラリー効果により流し込み反応させる)や、シリンジ法、マイクロプリンティング法、インクジェット法等の方法を利用することができる。

【0026】

添付の図面を参照してバイオ素子1とナノ微粒子6との分子認識反応の一例を説明する。図1に示すように、バイオ素子1の基板2上に配列された機能性分子4に分子認識反応により吸着した第三物質10を介して、ナノ微粒子6が機能性官能基(分子認識部位)9によりバイオ素子1に結合する。なお、図1は、機能性分子4及びターゲット分子8がビオチン分子で、かつ、第三物質10がストレプトアビジン分子である例であり、分子認識反応はビオチン-アビジン間の選択的吸着反応であり、機能性分子4(チオール化ビオチン)における機能性官能基5およびターゲット分子8(チオール化ビオチン)における機能性官能基9がそれぞれストレプトアビジン分子10における分子認識部位11に結合する。図1中の符号12は分子認識反応によりバイオ素子に結合したナノ微粒子を示す。

なお、ナノ微粒子は、基板表面に存在する機能性官能基と直接反応させてもよく、この例のように第三物質を介して間接的に反応させてもよい。

【0027】

図2に示すように、バイオ素子1の基板2上には図1で説明したような機能性分子4がアレイ状に配列され1つのユニット23を形成する。ユニット23において上述の分子認識反応が行われ、分子認識反応により適合すると識別された微粒子21は基板2上に結合し、適合しないと識別された微粒子は基板2には結合しない(22:欠損部)。本発明では、ユニット23は1測定領域であるが、1検出点は分子認識反応により適合すると識別された微粒子21である。

図3に示すように、バイオ素子1の基板2上にはユニット23が複数配列され、上述の反応が各ユニットにおいて行われる(なお、図3は、プラズモン現象を利用した光によるバイオ検出方法の説明図である)。

【0028】

次に、バイオ検出方法について説明する。

まず、従来のバイオ素子の検出について図7を参照しながら説明する。従来のバイオ素子の検出は、バイオ素子41上におけるユニット42について分子認識反応が行われたか否かを検出し、分子認識反応が行われたユニットの位置確認が行われていた。しかし、従来のバイオ素子は集積度が低いものしかできないため、このようなユニット単位(例えば42)ごとの検出で十分であったが、本発明のバイオ素子は1粒子単位で(すなわち1分子単位で)検出することができ、高集積化した大量点のデータを解析処理して、高感度検出を行う。

【0029】

このため本発明においては、例えば光を用いて光吸収又は光発光により検出を行う。特に平行光を用いることが好ましく、大量並列情報処理が可能となる。光吸収手段としては

プラズモン現象を利用した手法が好ましく用いられる。また、光発光手段としては量子発光を利用した手法が好ましく用いられる。

検出方法としては、走査型近接場顕微鏡により1次元デジタル情報としてバーコード的に読み取ることや、表面プラズモン顕微鏡、2次元内部反射型イメージングエリプソメトリ等により2次元アナログ情報として取り出し、例えば指紋や網膜照合と同様のフーリエ変換を使ったパターン認識処理により並列的に大量の情報処理を行うことが好ましい。プラズモン吸収を利用した表面プラズモン顕微鏡は、一度に多点のデータを画像情報(吸着による光反射率の局所的な変化)として取り込むことができるので特に好ましく用いられる。

図3は、プラズモン現象を利用した光によるバイオ検出方法の説明図である。レンズ31を適して、紫外光、可視光又は近赤外光をバイオ素子1に入射し、基板2上の金属薄膜あるいは機能性分子4が結合したナノ微粒子6に表面プラズモンを発生させ、出射光の光エネルギーを測定して局所的表面プラズモン共鳴分光測定を行い、フーリエ変換画像32として処理する。分子認識反応による微粒子吸着の有無により反射率が異なることを利用して、反応の有無を可視化することができる。プラズモン現象を利用した情報処理方法自体は、例えば、特開2002-22653号公報等に記載の方法を利用することができる。

【実施例】

【0030】

次に本発明を実施例に基づき更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0031】

(バイオ素子の作製)

縦1cm×横2cm×厚さ50 μ mのマイカ基板の片面に、厚さ1000Åで前記段落番号[0011]に記載の方法で、金単結晶膜を蒸着し、チオール化ビオチン(LCC Engineering & Trading GmbH製、商品名:41151-0895)の1mmolエタノール溶液に1時間浸漬して、バイオ素子基板を作製した。作製したバイオ素子の表面を原子間力顕微鏡(10 μ mスキャナー)を用いて観察した。図4に、バイオ素子表面の顕微鏡写真を示す。この写真の立体図では、分子の高さに相当する凹凸を観察することができる(1~2nm)。

【0032】

(分子識別反応I)

ストレプトアビジン(ファルマシア社製)5 μ モルのpH7.4緩衝溶液を、ビオチンが結合した基板(バイオ素子)に塗布し、反応させた。

【0033】

(ナノ微粒子の調製)

あらかじめHAuCl₄(H₂O)₄ 100mg(2.5 $\times 10^{-4}$ モル)をクエン酸三ナトリウム200mg(6.8 $\times 10^{-4}$ モル)の存在下で10分間還流して作製してあった、表面にクエン酸を有する金微粒子(平均粒子径20nm)を、チオール化ビオチンの1mmolエタノール溶液と混合し、室温で1~2時間攪拌して、ビオチンを固定した金微粒子を調製した。

【0034】

(分子識別反応II)

室温、大気下で前記金微粒子分散液を前記バイオ素子に滴下し、分子識別反応を行った。金微粒子結合後のバイオ素子表面の顕微鏡写真を図5に示す(原子間力顕微鏡(10 μ mスキャナー)を使用)。金微粒子相互の間隔はバイオ素子表面のパターン間距離に一致し、50~100nmであった。この写真から、微粒子吸着により局所的にドットの高さ(厚み)が増大したことがわかる(10~20nm)。分子識別反応が起きてナノ微粒子が結合した部分のみが高いコントラストで1粒1粒明るく光っているのを観察することができる。ナノ微粒子が結合した部分は、図4における反応前のナノドットと比べて著しく

膜厚が増大しているのがわかる。図5によれば、本発明のバイオ素子によれば高密度集積した金微粒子を1粒子単位で信号として高感度に検出できることがわかる。

【0035】

(ナノ微粒子の検出)

表面プラズモン共鳴分光法により図5に示したバイオ素子表面をさらに感度を増強して測定する方法を説明する。測定波長は632nmとした。レーザ入射角度を連続的に変化させて反射率を測定する。結果を図6にグラフとして示す。図6中、縦軸は表面プラズモン分光による基板の反射率(%)を、横軸はレーザの入射角度(度)を示し、(A)は金基板上にチオール化ビオチンが吸着した状態を、(B)はビオチンにストレプトアビジンが吸着した状態を、(C)はストレプトアビジン上にナノ微粒子が吸着した状態をそれぞれ示す。

図6から反射角55°のときに3つの状態の差異が最も明確となった。入射角を55°で固定すると、反射率の違いで各領域を区別して可視化できることがわかった。

また、図6から明らかなように、分子識別反応により吸収ピークのシフトが起きるが、従来の単分子膜吸着によるプラズモン吸収シフトに比べて、約100倍大きなシフトが見られた。このことは、吸着の有無を反射率変化で計測する場合、検出感度が従来の約100倍に増強されることを示し、本発明のバイオ素子は1粒子単位で高感度に検出することができることがわかる。

この結果は、表面プラズモン顕微鏡による場合、本発明例では非常に狭い領域について一度に極めて多点のデータを画像情報(吸着による光反射率の局所的な変化)として取り込むことができることを意味する。すなわち、従来法ではデータの集積度が低いものしかできず、信号としてユニット単位で○×の基準で判定するに留まっていたが、本発明は例えば100ドット中95ドット反応といったデジタル段階表示で高精度提示が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、基板上に配列された機能性分子とナノ微粒子との分子認識反応の説明図であり、図1(a)はナノ微粒子との分子認識反応前のバイオ素子の状態を、図1(b)はナノ微粒子との分子認識反応後のバイオ素子の状態を表す。

【図2】図2は、分子認識反応後のバイオ素子上における1ユニットの斜視図である。

【図3】図3は、プラズモン現象を利用した光によるバイオ検出方法の説明図である。

【図4】図4は、本実施例におけるバイオ素子表面の原子間力顕微鏡写真である。

【図5】図5は、本実施例におけるバイオ素子表面の原子間力顕微鏡写真である。

【図6】図6は、本実施例における表面プラズモン吸収ピーク位置のシフトを示すグラフである。

【図7】図7は、従来のバイオ検出方法の説明図である。

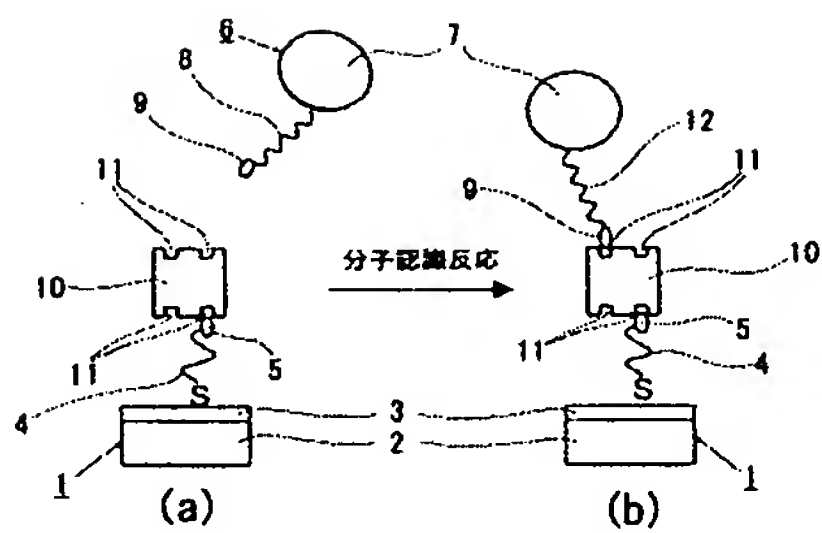
【符号の説明】

【0037】

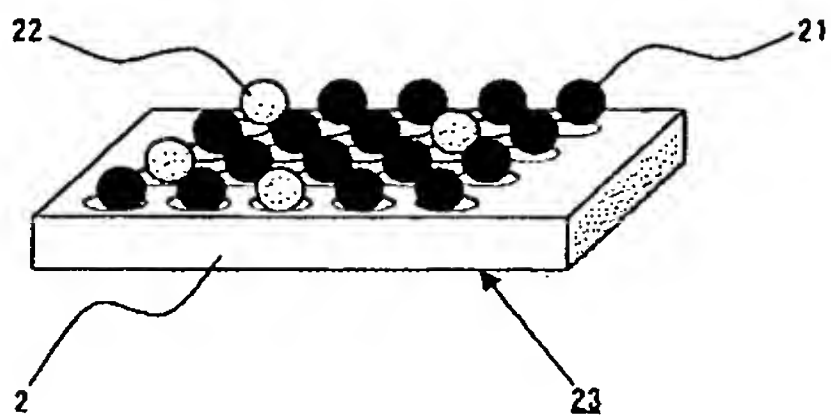
- 1 バイオ素子
- 2 基板
- 3 金属薄膜
- 4 機能性分子(チオール化ビオチン)
- 5 機能性分子における機能性官能基(分子認識部位)
- 6 ナノ微粒子
- 7 金属又は半導体の粒子
- 8 ターゲット分子(チオール化ビオチン)
- 9 ターゲット分子における機能性官能基(分子認識部位)
- 10 第三物質(ストレプトアビジン分子)
- 11 第三物質における分子認識部位
- 12 分子認識反応によりバイオ素子に結合したナノ微粒子

- 21 分子認識反応により適合すると識別された微粒子（1検出点）
- 22 分子認識反応により適合しないと識別された微粒子（欠損部）
- 23 ユニット（1測定領域）
- 31 レンズ
- 32 フーリエ処理画像
- 41 バイオ素子
- 42 ユニット（1測定領域、1検出地点）

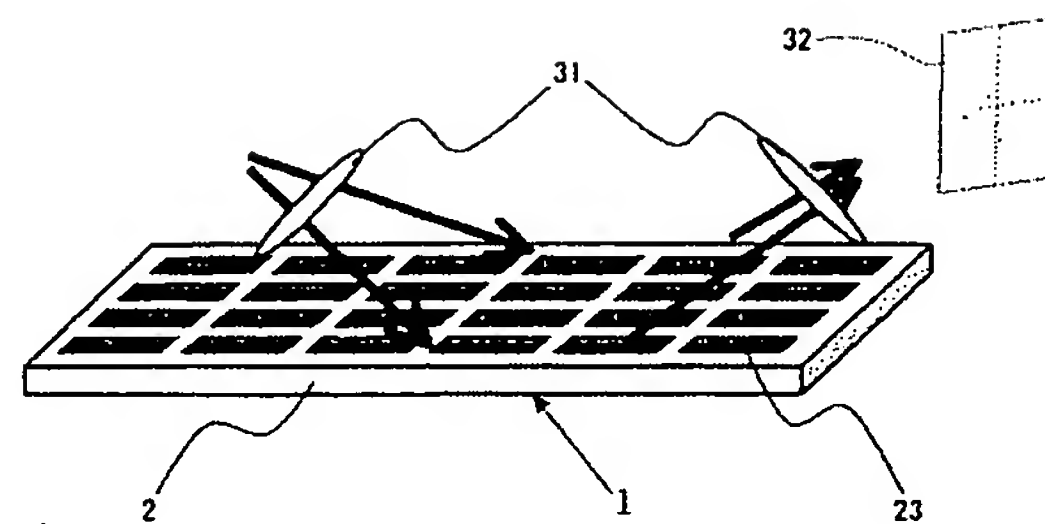
【図1】



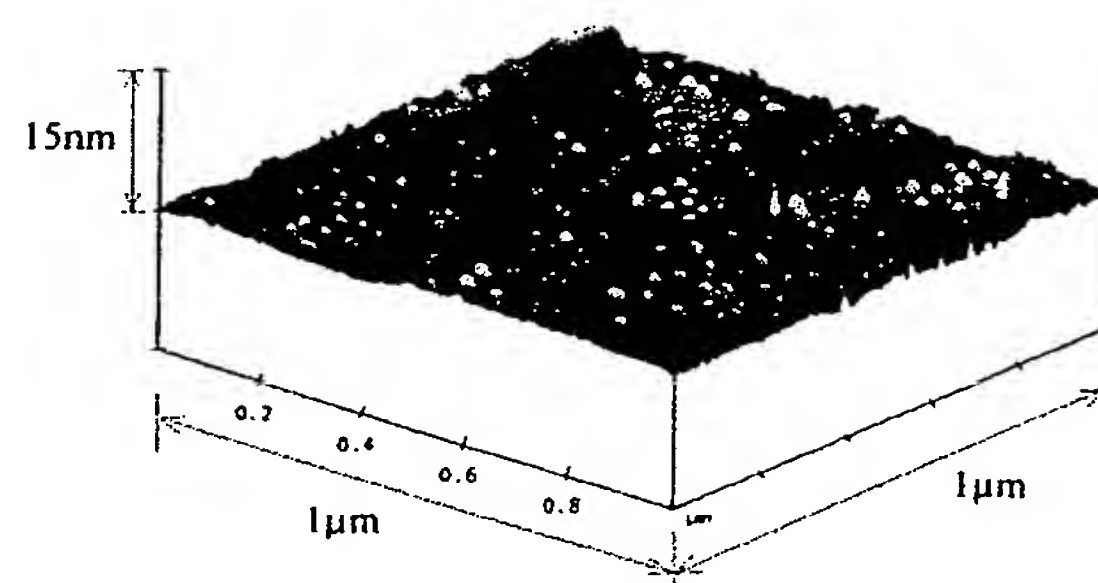
【図2】



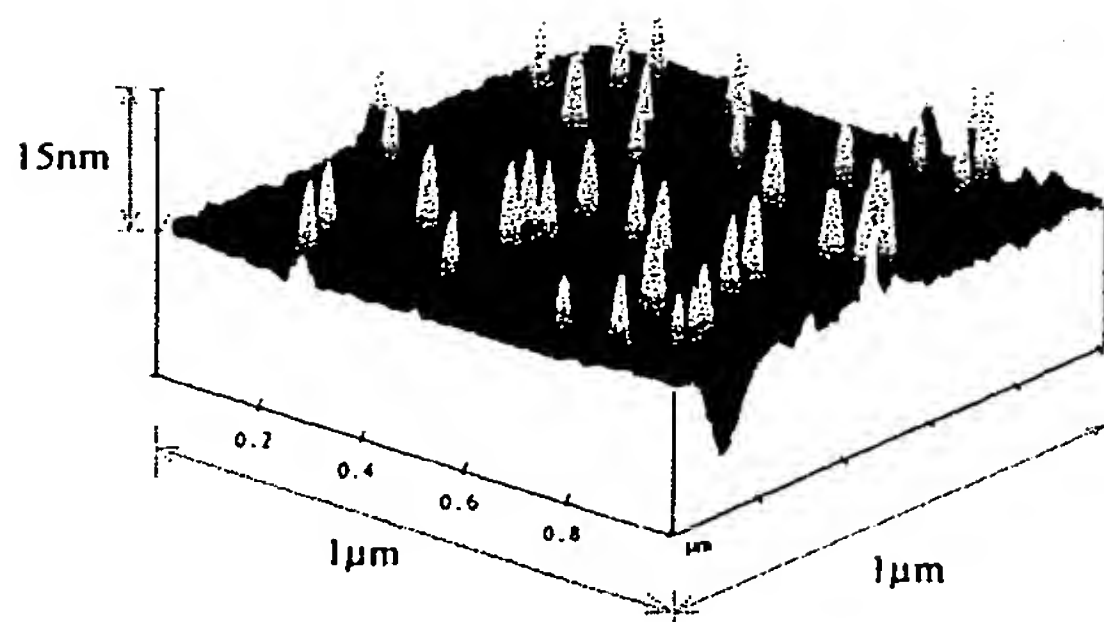
【図3】



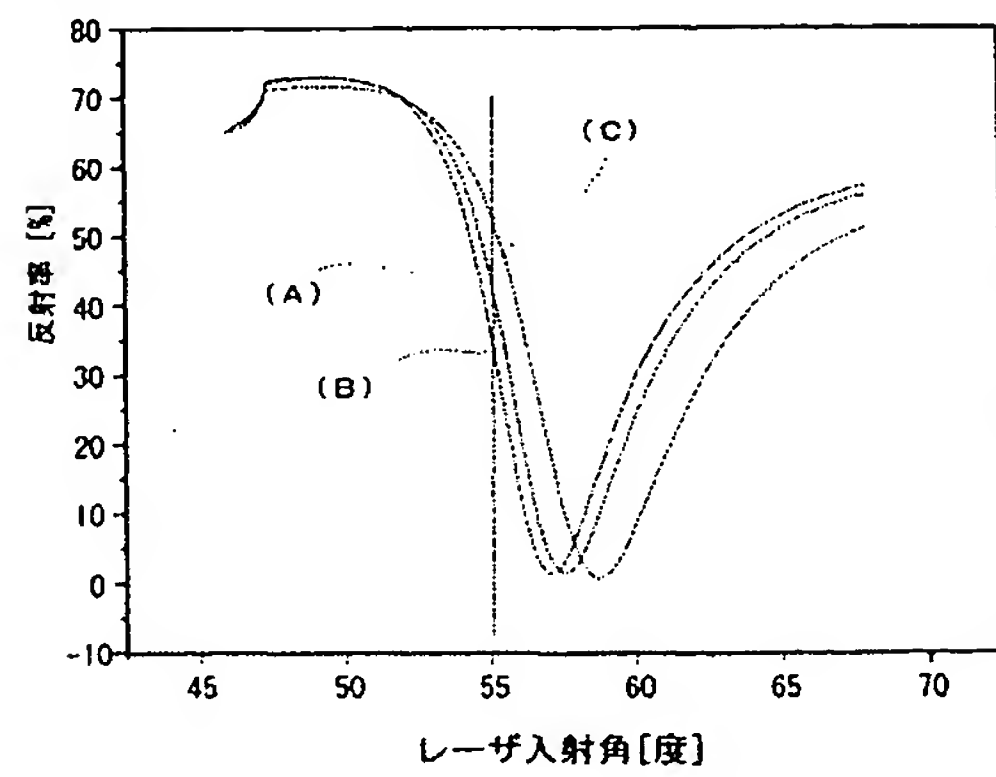
【図4】



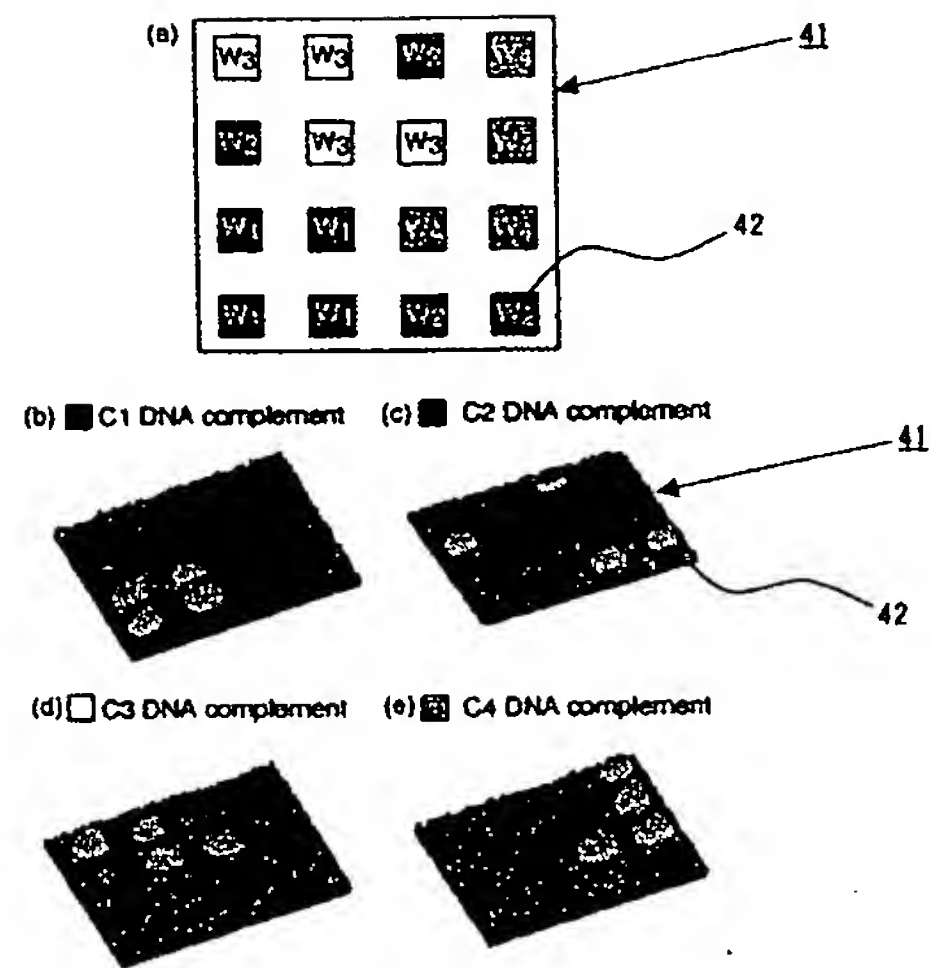
【図5】



【図6】



【図7】



(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 37/00

F I

G 0 1 N 33/543 5 9 5

G 0 1 N 37/00 1 0 2

テーマコード (参考)